

# 开发用于 N-糖释放和标记的快速 2-AB 样品前处理工作流程

## 作者

Vaishali Sharma,  
Andres Guerrero, John Yan,  
Aled Jones, Michael  
Kimzey, Emily Dale,  
Ted Haxo, Sergey Vlasenko  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

N-糖的表征对生物治疗药物的开发至关重要。通常，使用标签对酶促释放的 N-聚糖进行衍生化，以便通过 HILIC UHPLC-FLR 和 UHPLC/MS 进行荧光 (FLR) 和质谱 (MS) 检测。N-糖的样品前处理通常需要数小时乃至数天才能完成。尽管 Agilent InstantPC (原 ProZyme) 等较新的荧光标签提供了 FLR 和 MS 高灵敏度，但使用 2-AB (2-氨基苯甲酰胺) 标签获得 N-糖数据已有 20 多年的历史，已在许多实验室中成熟应用。本应用简报介绍了快速 N-糖样品前处理工作流程的开发和应用，使用 5 分钟溶液内去糖基化步骤，然后直接在基质上进行 2-AB 标记和净化，无需干燥步骤，样品可在 2 小时左右完成准备用于分析。

文中展示的比较研究由两种单克隆抗体 (美罗华、NISTmAb) 和一种 Fc 融合蛋白 (恩利) 组成，使用安捷伦提供的两种不同的 N-糖样品前处理工作流程：1) 使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep 快速 N-糖前处理；2) 使用 2-AB Express (原 ProZyme) 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理。与传统样品前处理方法相比，Agilent AdvanceBio Gly-X 技术和 2-AB Express 标记可大大缩短获得结果的时间。

## 前言

N-糖的位置和结构在治疗性蛋白质的药理学中发挥着重要作用，可能会影响免疫原性、药代动力学和药效学<sup>[1]</sup>。这使得 N-糖的表征成为生物治疗性药物开发过程中的重要环节。N-糖不包含适合使用标准液相色谱 (LC) 技术进行在线检测的发色团或荧光团，因此通常在使用 PNGase F 酶促释放后，通过还原胺化化学 (图 1) 用 2-AB 等荧光标签将其衍生化。用于此目的的常用还原剂是氰基硼氢化钠<sup>[2]</sup>。传统的 2-AB 标记方法需要多个步骤，包括标记前干燥游离多聚糖和后续净化多余的染料标记，可能需要数小时甚至数天才能完成<sup>[3]</sup>。使用 2-AB 等传统还原胺化染料的 GlykoPrep 简化了样品前处理过程，可在 4-5 个小时内完成。使用 2-AB Express 的 Gly-X N-糖前处理工作流程简便快速。

该流程中，溶液内去糖基化在 5 分钟内释放 N-糖，并在固态基质上完成 2-AB 标记，然后用乙腈洗去基质上多余的染料，

并用去离子水洗脱标记的样品。样品通常可在 2 小时内完成准备，等待 UHPLC 分析 (图 2)。

### N-糖的 2-AB 还原胺化

2-AB

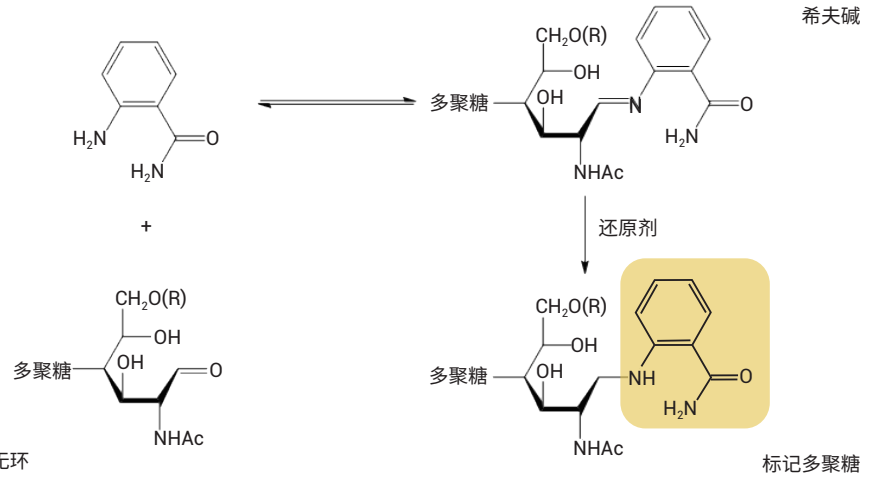
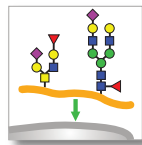


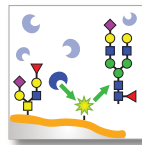
图 1. 使用 2-AB 标记酶促释放的 N-糖。染料的伯胺作用于无环还原糖的羰基碳，形成部分席夫碱。席夫碱的亚胺基团经化学还原得到标记的多聚糖

### N-糖样品前处理工作流程

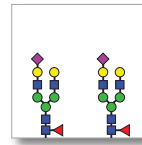
使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep  
总时间约 3.5 小时  
基质上去糖基化  
溶液内标记  
基质上净化  
自动化就绪模式



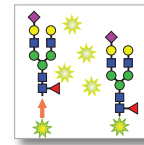
变性  
5 min



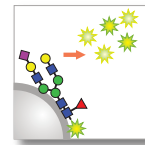
去糖基化  
15-60 min



干燥  
30-60 min

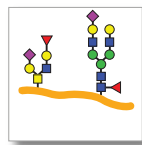


标记  
60 min

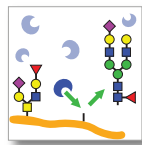


净化  
15-30 min

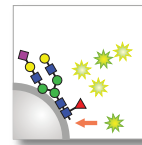
使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X  
总时间约 2 小时  
溶液内去糖基化  
基质上标记和净化  
自动化就绪模式



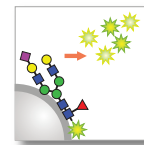
变性  
3 min



去糖基化  
5 min



标记  
60 min  
无需干燥  
氰基硼氢化钠  
或开发中的替代  
还原剂



净化  
10-15 min



固相  
真空条件

图 2. N-糖样品前处理工作流程：Agilent GlykoPrep 和使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X

## 方法

### 样品前处理

对美罗华（批号 H0102B03）、恩利（批号 R170724）和 NIST 单克隆抗体参比物质 8671 (NISTmAb)（批号 14HB-D-002）的 N-糖样品进行前处理，工作流程为使用 2-AB 的 Agilent Glyko-Prep 快速 N-糖前处理 (GP96NG-AB) 和使用 2-AB Express 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理 (GX96-2AB, 原 Prozyme)，按照标准推荐方案，每次前处理使用 50  $\mu\text{g}$  蛋白质。所有样品平行配制 3 份。

### HILIC-UHPLC 分析

分析前将洗脱样品的最终体积调整为 100  $\mu\text{L}$ （进样量 1  $\mu\text{L}$ ）。使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离多聚糖。HILIC-UHPLC 分离在 Amide 2.1  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  色谱柱上进行，用 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4)，梯度为 2.5–50 分钟内 25%–38%，流速为 0.4 mL/min。通过荧光检测标记的多聚糖，Ex/Em 为 360/428 (nm)。与现有安捷伦数据、LC/MS 质量测定结果<sup>[4,5]</sup> 和 NISTmAb 已发表数据<sup>[6,7]</sup> 进行比较，以确定多聚糖归属。

## 结果与讨论

对 2-AB 标记 N-糖的 HILIC-UHPLC 分析表明，两种不同的样品前处理方法（使用 2-AB 的 GlykoPrep 和使用 2-AB Express 的 Gly-X）之间的结果相当。

- **美罗华：**与 CHO 细胞中产生的大多数单克隆抗体类似，美罗华的糖基化模式主要由中性二天线型多聚糖组成，其中 G0F、G1F[6]/G1F[3] 和 G2F 为主要成分，并含有低含量的唾液酸化和高甘露糖多聚糖（图 3）

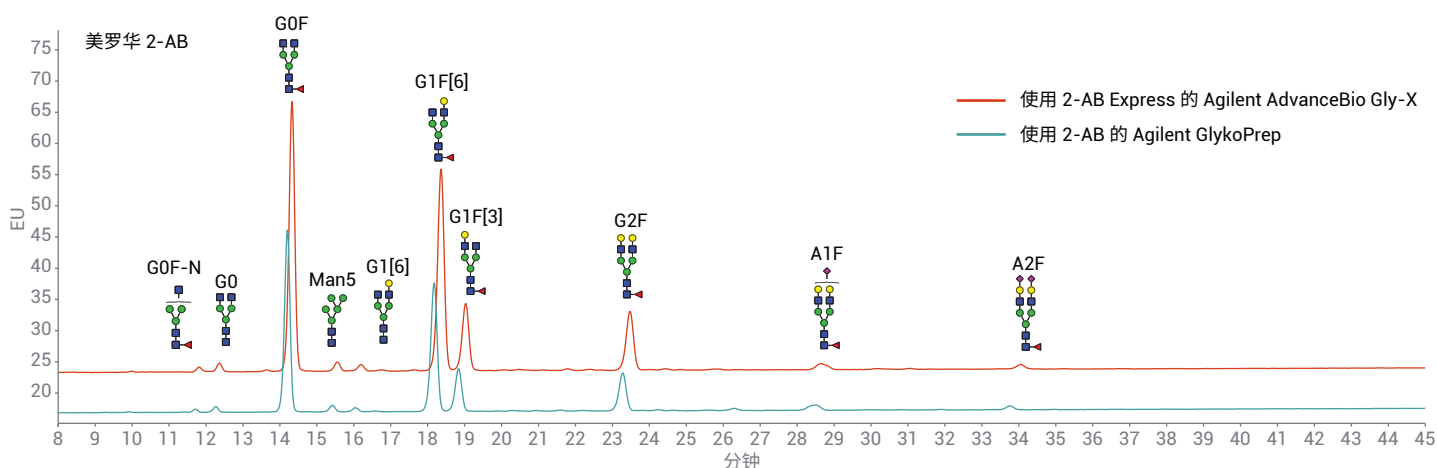


图 3. 美罗华 N-糖的 2-AB UHPLC 荧光叠加图谱，前处理流程为使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep 和使用 2-AB Express 进行标记的 Agilent AdvanceBio Gly-X

- **恩利:** 与美罗华相比, 恩利的糖基化谱图包含更高含量的唾液酸化及非岩藻糖基多聚糖, 如观察到的 A1F、A2F、A1 和 A2 (图 4)
- **NISTmAb:** 与美罗华类似, NISTmAb 主要含 G0F、G1F[6]/[3] 和 G2F。然而, NISTmAb 还包含在中性物质上具有单和双半乳糖- $\alpha$  (1,3)-半乳糖表位的多聚糖 (图 5), 与已发表的数据一致<sup>[6]</sup>

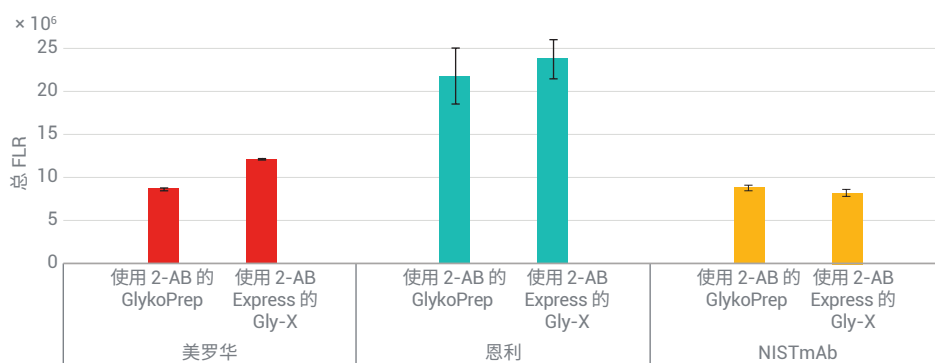


图 6. 2-AB 总荧光响应比较。多聚糖取自当量的糖蛋白 (美罗华、恩利、和 NISTmAb), 前处理流程为使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理和使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep 快速 N-糖前处理。在 UHPLC-FLR 分析之前, 所有洗脱样品均调整至 100  $\mu$ L 的最终体积 (进样量 1  $\mu$ L)

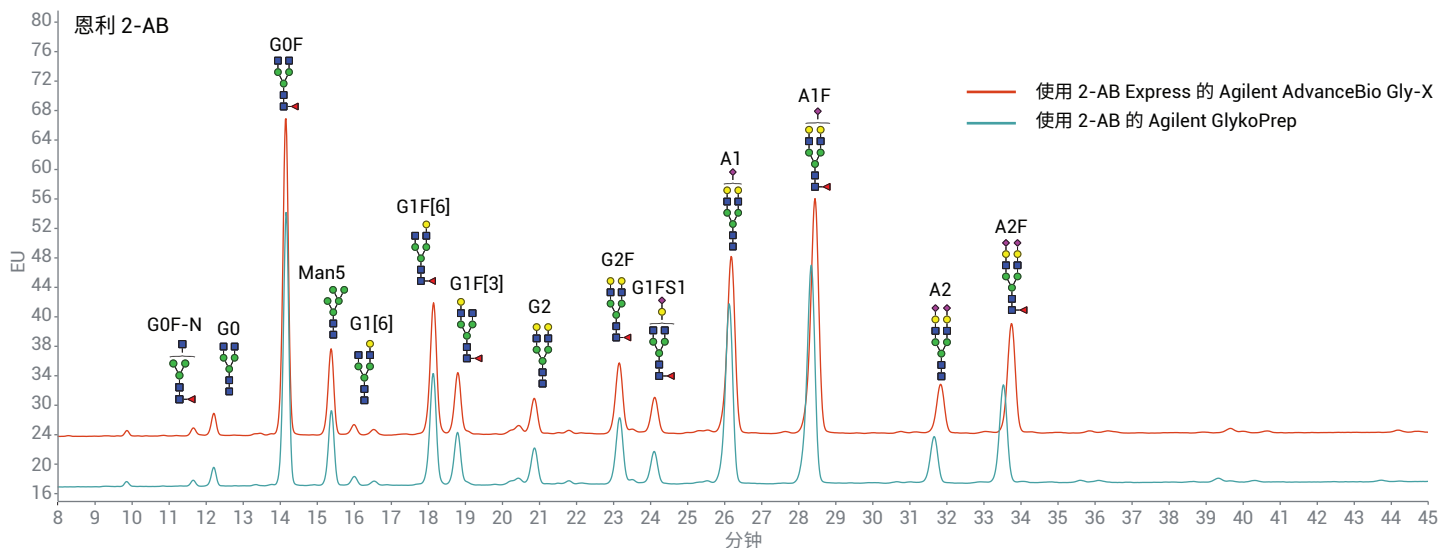


图 4. 恩利 N-糖的 Agilent 2-AB UHPLC 荧光叠加图谱, 前处理流程为使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X 和使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep

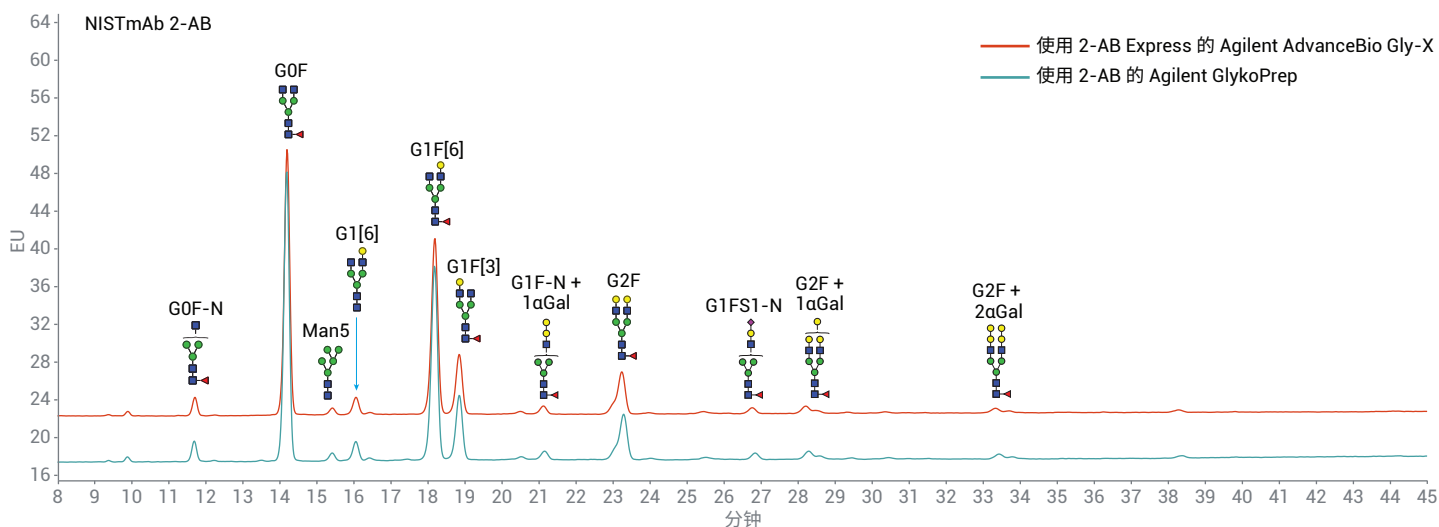


图 5. NISTmAb N-糖的 2-AB UHPLC 荧光叠加图谱, 前处理流程为使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理和使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep 快速 N-糖前处理

- 与 GlykoPrep 相比，Gly-X 样品前处理的美罗华和恩利分子可观察到更高的总荧光信号。NISTmAb 的总荧光信号与 Gly-X 和 GlykoPrep 相当
- 对于测试的三种分子，两种样品前处理方法获得了类似的相对面积百分比结果（图 7）

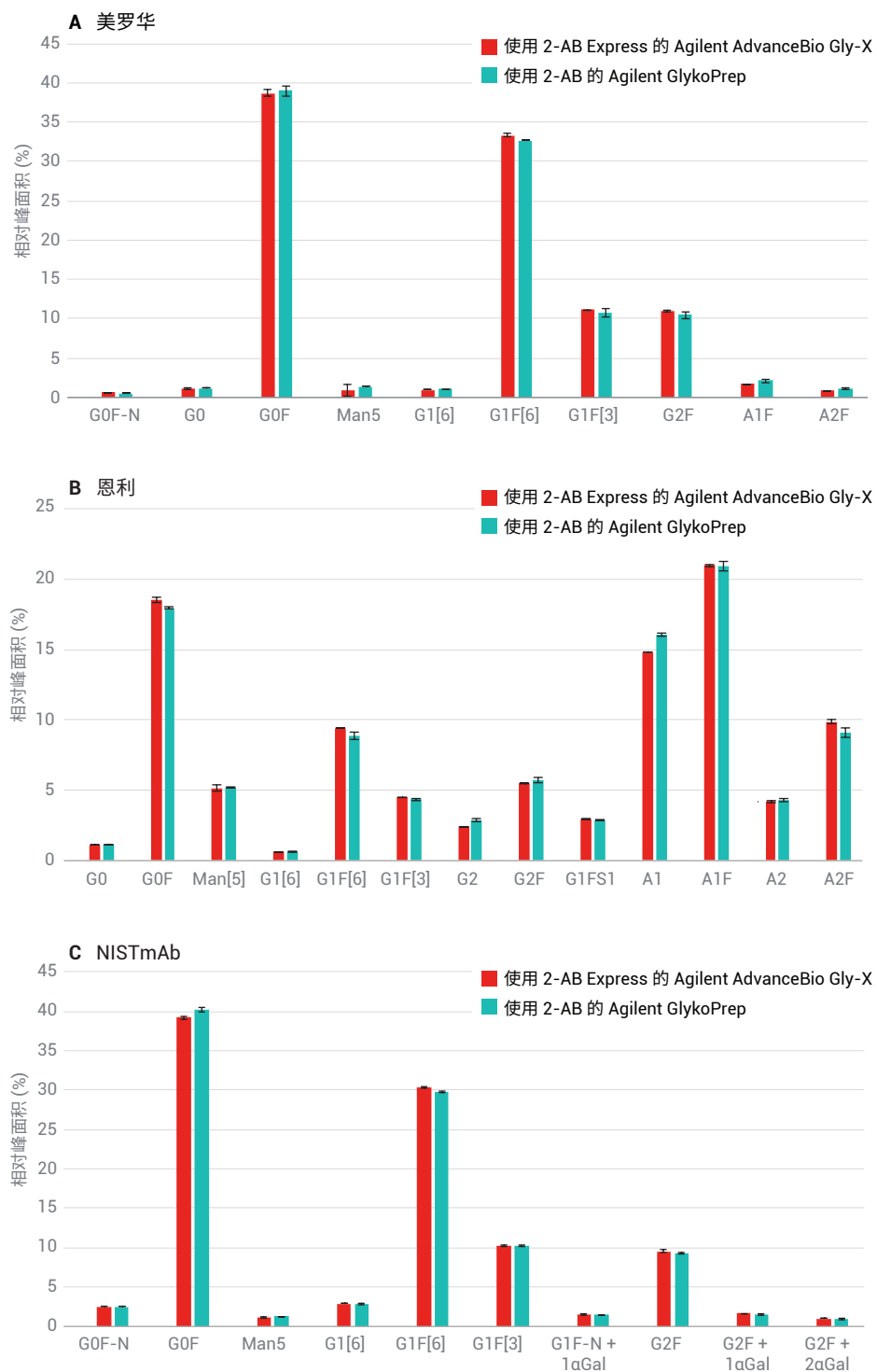


图 7. 使用 2-AB 的 Agilent GlykoPrep 和使用 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X 前处理得到的 N-糖相对面积百分比的比较。(A) 美罗华, (B) 恩利, (C) NISTmAb。美罗华/恩利报告中, 多聚糖相对面积 > 0.5%, NISTmAb 中相对面积 > 1.0%

## 结论

- Agilent GlykoPrep 快速 N-糖前处理工作流程使用 2-AB 对游离 N-糖进行标记, 可提供可重现且可靠的结果, 可直接与历史数据进行比较
- 相比传统 2-AB 标记, 使用 2-AB Express 的 AdvanceBio Gly-X 提供快速的工作流程, 无需冗长的干燥步骤, 缩短了获得结果的时间
- 使用 GlykoPrep 和 Gly-X 对美罗华、恩利和 NISTmAb 中的 N-糖进行前处理和 2-AB 标记, 在总荧光信号和相对百分比面积结果上获得了相当的数据
- NISTmAb N-糖谱图与发表的数据一致

## 参考文献

1. Liu, L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*(6), 1866–1884
2. Ruhaak, R.; et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem.* **2010**, *397*(8), 3457–3481
3. Aich, U.; et al. State-of-the-art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of N-glycans from antibodies. *Electrophoresis* **2016**, *37*(11), 1468-88
4. Kimzey; et al. Development of an instant glycan labeling dye for high throughput analysis by mass spectrometry (用于高通量质谱分析的即时多聚糖标记染料的开发), 安捷伦 ASMS 海报, **2015**
5. Yan; et al. Comparison of common fluorescent labels for liquid chromatography analysis of released N-linked glycans (游离 N-糖的液相色谱分析中常用荧光标记的比较), 安捷伦 ASMS 海报, **2017**
6. De Leoz, M.L.A.; et al. NISTIR 8186: NIST Interlaboratory Study on the Glycosylation of NISTmAb, a Monoclonal Antibody Reference Material, June 2015 to February 2016. **2017**, <http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/ir/2017/NIST.IR.8186.pdf>
7. Hilliard, M.; et al. Glycan characterization of the NIST RM monoclonal antibody using a total analytical solution: From sample preparation to data analysis. *MAbs* **2017**, Sep 12:1-11. doi: 10.1080/19420862.2017.1377381. [Epub ahead of print].

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限科研使用。不用于临床诊断用途。

DE.6002662037

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2020

2020 年 5 月 21 日, 中国出版

5994-0945ZHCN

TN 4012

修订版 B